

第3部門第2区分

(43)公表日 平成6年(1994)1月27日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

A 61 K 9/70

37/24

47/42

A 61 L 15/44

識別記号

3 5 8

A D S

C 7433-4C

府内整理番号

7038-4C

8314-4C

7433-4C

F I

7108-4C

A 61 L 15/ 03

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 15 頁)

(21)出願番号 特願平5-501020

(86) (22)出願日 平成4年(1992)6月11日

(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)2月12日

(86)国際出願番号 PCT/US92/04929

(87)国際公開番号 WO92/22304

(87)国際公開日 平成4年(1992)12月23日

(31)優先権主張番号 715, 165

(32)優先日 1991年6月14日

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 716, 862

(32)優先日 1991年6月18日

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AU, CA, JP

(71)出願人 アムジエン・インコーポレーテッド

アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320

-1789、サウザンド・オーツ、デハビル  
ランド・ドライブ・1840

(72)発明者 ソング、スクーズ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・93021、  
ムーアパーク、アルダーブルツク・ストリ  
ート・12070

(72)発明者 モラウイツキ、アンドリュー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・93010、  
カマリロ、ウォーカー・アベニュー・684

(74)代理人 弁理士 川口 義雄(外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コラーゲンフィルムによるタンパクのドラッグ・デリバリー

(57)【要約】

本発明は医薬品の放出供給維持性を改善するために有用な単層及び多層コラーゲンフィルムに関するものである。

## 求の範囲

- 第一速度制御層及び少なくとも一つ以上の医薬肝臓層からなるコラーゲンフィルムであって、各層が互いに接触して複層体を形成し、該複層体の片側末端に速度制御層が位置し、かつ速度制御層が他層の内の一層のみと接触し、該他層が医薬肝臓層であるコラーゲンフィルム。
- 速度制御層がコラーゲン及び活性成分からなる請求項1記載のコラーゲンフィルム。
- 速度制御層にいかなる活性成分をも含まない請求項2記載のコラーゲンフィルム。
- 各医薬肝臓層がコラーゲン及び活性成分からなる請求項3記載のコラーゲンフィルム。
- 医薬肝臓層の数が1～5である請求項4記載のコラーゲンフィルム。
- 医薬肝臓層の数が1～3である請求項5記載のコラーゲンフィルム。
- 医薬肝臓層の数が3である請求項6記載のコラーゲンフィルム。

コラーゲンフィルム。

- 医薬肝臓層がさらに緩衝剤をも含んでなる請求項7記載のコラーゲンフィルム。
- 活性成分がPDGF, EGF, FGF, PDGF, PD-EGF, PD-EGF, KGF, IGF-1, IGF-2, TNF, BDNF, CNTF, 及びNT-3からなる群より選ばれる請求項8記載のコラーゲンフィルム。
- 活性成分がPDGFである請求項9記載のコラーゲンフィルム。
- 請求項1記載のコラーゲンフィルムを介して、創傷治癒に有効な量の活性成分を投与する上皮創傷治癒促進方法。
- 第二速度制御層を、複層体において第一速度制御層の位置する末端と逆側の末端に、含んでなる請求項1記載のコラーゲンフィルム。
- 各速度制御層がコラーゲン及び活性成分からなる請求項11記載のコラーゲンフィルム。
- 速度制御層がいかなる活性成分をも含まない請求項12記載のコラーゲンフィルム。
- 医薬肝臓層がコラーゲン及び活性成分からなる請求項14記

- 速度制御層及び各医薬肝臓層の肉厚が、それぞれ独立して約0.1mm～約1mmである請求項7記載のコラーゲンフィルム。
- 速度制御層及び各医薬肝臓層の肉厚が、それぞれ独立して約0.15～約0.5mmである請求項8記載のコラーゲンフィルム。
- 速度制御層及び各医薬肝臓層の肉厚が、それぞれ独立して約0.1～約0.2mmである請求項9記載のコラーゲンフィルム。
- 速度制御層がさらに可塑剤をも含んでなる請求項10記載のコラーゲンフィルム。
- 医薬肝臓層がさらに可塑剤をも含んでなる請求項11記載のコラーゲンフィルム。
- 速度制御層がさらに安定剤をも含んでなる請求項12記載のコラーゲンフィルム。
- 医薬肝臓層がさらに安定剤をも含んでなる請求項13記載のコラーゲンフィルム。
- 速度制御層がさらに乾燥促進剤をも含んでなる請求項14記載のコラーゲンフィルム。
- 医薬肝臓層がさらに乾燥促進剤をも含んでなる請求項15記載のコラーゲンフィルム。
- 速度制御層がさらに緩衝剤をも含んでなる請求項16記載の

コラーゲンフィルム。

- 医薬肝臓層の数が1～5である請求項17記載のコラーゲンフィルム。
- 医薬肝臓層の数が1～3である請求項18記載のコラーゲンフィルム。
- 医薬肝臓層の数が、3である請求項19記載のコラーゲンフィルム。
- 各速度制御層及び各医薬肝臓層の肉厚が、それぞれ独立して約0.01～約1mmである請求項20記載のコラーゲンフィルム。
- 各速度制御層及び各医薬肝臓層の肉厚が、それぞれ独立して約0.05～約0.5mmである請求項21記載のコラーゲンフィルム。
- 各速度制御層及び各医薬肝臓層の肉厚が、それぞれ独立して約0.01～約0.2mmである請求項22記載のコラーゲンフィルム。
- 速度制御層がさらに、可塑剤をも含んでなる請求項23記載のコラーゲンフィルム。
- 医薬肝臓層がさらに可塑剤をも含んでなる請求項24記載のコラーゲンフィルム。
- 速度制御層がさらに安定剤をも含んでなる請求項25記載のコラーゲンフィルム。

15. 医薬防腐層がさらに安定剤をも含んでなる請求項14記載のコラーゲンフィルム。

16. 速度制御層がさらに乾燥促進剤をも含んでなる請求項14記載のコラーゲンフィルム。

17. 医薬防腐層がさらに乾燥促進剤をも含んでなる請求項15記載のコラーゲンフィルム。

18. 速度制御層がさらに緩衝剤をも含んでなる請求項16記載のコラーゲンフィルム。

19. 医薬防腐層がさらに緩衝剤をも含んでなる請求項17記載のコラーゲンフィルム。

20. 活性成分がPDGF, EGF, FGF, PDGF, PD-EGF, KGF, IGF-1, IGF-2, 及びTNFからなる群より選ばれる請求項31記載コラーゲンフィルム。

21. 活性成分がPDGFである請求項19記載のコラーゲンフィルム。

22. 請求項21記載のコラーゲンフィルムを介して創傷治癒に有効量の活性成分を投与する内部創傷治癒の促進方法。

23. 少なくとも一つ以上の医薬防腐層からなり、該医薬防腐層が互いに接触し、複層体を形成してなるコラーゲンフィルム。

## 明細書

## コラーゲンフィルムによるタンパクのドラッグ・デリバリー

## 発明の背景

本発明は、1991年6月14日の“コラーゲンフィルムによるタンパクのドラッグ・デリバリー”米国特許出願番号11/115,165からなる一部既録出願である。本発明は単層及び多層のコラーゲンフィルムからなり、医薬の放出特性に改良を加えた、優れた性質を持つものに調達する。

コラーゲンを含む多種の膜が先行技術に於いて使用されている。Leiberman他が(Surg. Forum 16: 171-178, 1965) 2~3μ厚のコラーゲンフィルムをウシ皮より抽出したコラーゲンを加熱脱水することによって得たものを発表している。また、Ciesiは非化学的架橋コラーゲンを圧縮生成することによって得た医薬放出性維持に優れたコラーゲン多層を開示している[1986年7月9日公開の欧州特許出願181114、1986年7月15日発行の米国特許(, 810,531、米国特許1,655,181 1987年4月7日発行、米国特許(, 819,319 1987年4月25日発行、PCT特許出願WO 86/00011 1986年6月21日公開]。Ciesi [米国特許(, 11,147 1988年11月1日発行]は本質的に純粋なコラーゲン

ゲンシートを有機酸へのコラーゲン分散液の凍結乾燥により作成し、開示した。Leiberman他 [欧州特許出願167,121 1984年1月15日公開、米国特許4,641,111 1987年2月11日発行]はコラーゲン及びポリューアミノ酸の2層から構成される人工皮膚を開示した。Leiberman [米国特許4,111,952 1981年6月21日発行]は接着層、架橋コラーゲン基質、多層高分子フィルムの3層から構成される創傷被覆材を開示した。Leiberman (米国特許4,150,699 1980年8月21日発行)はアクリル系粘着剤に10%未満のコラーゲンを含有させてなる創傷被覆材を開示した。

Ciesi他 [英国特許1,317,582]はコラーゲン基質の高分子分散液の凍結乾燥により得られるコラーゲン創傷被覆材を開示した。Stellile他 (欧州特許669260 1983年1月12日公開)は天然の純度の高いコラーゲンからなるコラーゲン込み物を開示した。Leiberman他 (米国特許4,151,911 1984年6月12日発行)はフィブリノーゲン、第8凝固因子、及び/またはトロンビンをコーティングしたコラーゲンを含む創傷治療組成材を開示した。

Leiberman他 (米国特許4,811,102 1988年2月発行)はコラーゲン、生分解性高分子、腫瘍壞死因子を含んでなる創傷治

表面を開示した。U.S. 4,411,111 [J. Bloedel, M. L. Lee, U.S. 4,411,111] はコラーゲンを含有する数例より、人工皮膚の概念を述べている。U.S. 4,411,111 他の Int. Pat. Connect. Title Int. 1: 1-61(1973)、特に 51~52 ページ及び Pichot et al. Int. Pat. Connect. Title Int. 1: 4-55(1981) の様々なコラーゲンの利用法の報告の中に医薬放出媒体としての利用があった。

さらに、付け加えるならば、コラーゲンは医薬含有スポンジの構成として利用されている [Arizmendi、米国特許 3,157,511 1964 年 11 月 12 日発行や Terrell 他の米国特許 4,110,211 1982 年 3 月 11 日発行や Deville 他の Scanning Electron Microscopy Ⅲ: 1311-1320 (1981) や Deville 及び Silber の Biomaterials 1: 3-1 (1980) や Deville 他の Biomaterials 1: 195-200 (1981) や Oliveros et al. [Int. Pat. Connect. 1: 311-313 (1976) や Collins 他の Surg. Forum 27: 511-531 (1976)] 報告がある。またコラーゲンを医薬含有の軟膏の構成として利用する [PCT 特許出願 WO 0 16/13112 1986 年 6 月 5 日公開] 報告もある。

コラーゲンはまた感電創傷の治療にも利用されている (米国特許 4,111,311 1990 年 6 月 26 日発行)。

薬局層からなるコラーゲンフィルムであり、ここで言う層とは互いに接触しており複層形態をなす医薬貯蔵層である。

好みしくは、速度制御及び/または医薬貯蔵層には、さらに可塑剤及び/または安定剤及び/または乾燥促進剤及び/または緩衝剤を含む。活性成分は好みしくは次に列挙する群より選ばれる。PDGF, EGF, FGF, PDEGF, PD-ECGF, KGF, IGF-1, IGF-2, TNF, BDNF, CNTF, NT-3。

より好みしくは、活性成分は PDGF か PD-ECGF のいずれかが選ばれる。

本発明のもう一つの主題としては、第二の速度制御層をさらに有するコラーゲンフィルムであり、ここで言う第二速度制御層とは第一速度制御層のある側と反対側の複層末端に位置するものである。

本発明のもう一つの主題としては、本発明のコラーゲンフィルムを介して創傷治療に有効量の活性成分を投与し上皮創傷の治療を促進する方法である。

本発明のもう一つの主題としては、複層体の向い合った両末端に二つの速度制御層を有するコラーゲンフィルムを介して創

先行のコラーゲン含有フィルムの利用技術によって、いくつかの放出持特性が報告されているが、それらは決して上の安定性をもたず、そればかりか、治療用薬剤の放出時間にも持続性がなかった。

本発明は創傷被覆材に要求される多くの改善をはかり、安定性及び治療用薬剤の放出時間に持続性を与えるものである。

#### 発明の要約

本発明は、まず速度制御層及び 1 層またはそれ以上の医薬貯蔵層とからなるコラーゲンフィルムに関するものであり、ここで言う層とは互いに接触し、複層形態を形成し、速度制御層は複層物の片側の末端に存在する。

この条件においては速度制御層は片面のみ他層と接触しており、その他の層が医薬貯蔵層となる。速度制御層には活性成分を含まないことが好みしく、より好みしくは 1~5 層の医薬貯蔵層を有する。

好みしくは、医薬貯蔵層及び/または速度制御層の内厚は約 0.11~約 1.11mm であり、より好みしくは約 0.15~約 0.5mm の内厚を有し、最も好みしくは約 0.11~約 0.12mm の内厚を有する。

本発明のもう一つの主題としては、1 層またはそれ以上の医

薬の治療に効果的な量の活性成分を投与することによって内部の創傷の治療を促進する方法である。

#### 図の説明

図 1 は例 1 B に記述した通り不溶性コラーゲン繊維より作成した単層コラーゲンフィルム (内厚 0.1mm) からの PDGF の放出速度挙動を示している。

図 2 は例 1 B に記述した通り不溶性コラーゲン繊維より作成した単層コラーゲンフィルム (内厚 0.11mm) からの PDGF の放出速度挙動を示している。

図 3 は例 1 B に記述した通り不溶性コラーゲン繊維より作成した単層コラーゲンフィルム (内厚 0.11mm) からの PDGF の放出速度挙動を示している。

図 4 は例 2 に記述した通り可溶性コラーゲンより作成した二層複層コラーゲンフィルム (内厚 0.01-0.1mm) からの PDGF の放出速度挙動を示している。

図 5 は例 3 に記述した通り可溶性コラーゲンより作成した四層複層コラーゲンフィルム (内厚 0.01-0.1mm) からの PDGF の放出速度挙動を示している。

図 6 は例 1 A に記述した通り、可溶性コラーゲンより作成し

た单層コラーゲンフィルム（内厚0.01-0.1mm）からの多種の活性成分の放出速度挙動を示している。

図7はCollar Transwell Cell 試料中のタンパク濃度の測定値であり、次の異なる3つの方法で測定した。

ELISA法（黒塗り印）、<sup>111</sup>IラベルPDGF（白四角印）、<sup>3</sup>H-トリミジン取り込み分析法（黒四角印）。

図8は創傷の治癒進行端部における肉芽組織の最大値（明確線では単位はmm）及び新生肉芽組織のおおよその面積と体積の計算測定値である（暗線で単位はmm）。ただし、これらは創傷が同心円的に治癒が進み収縮しないと仮定して行なった。

図9は動物の胃部位に付けた線形状創傷の引き裂き強度においてPDGFの影響を無治療の動物と比較した結果である。

#### 発明の詳細な説明

本発明は一つまたは、二つの速度制御層と一つまたはそれ以上の医薬肝臓層とからなるコラーゲンフィルムに関するものであり、ここで言う層とは複層状態となり互いに接触している。

ここで速度制御層は複層体の片側または両側の末端に存在し、その片側の面のみが他層と接触しているものと定義する。その他の層を医薬肝臓層と定義する。好ましくは、複層体の片末端に、唯一

の速度制御層を持ったものが良い。

速度制御層は可溶性コラーゲンの溶液から生成することができる。

溶性コラーゲンは平均分子量が100,000未満のコラーゲンであり、好ましくは約100,000の分子量を持つものである。

特に適合する可溶性コラーゲンはTitipore Co., Inc. (Santa Barbara, California, United States) である。この特別な可溶性コラーゲンはさらに次の利点がある。

この可溶性コラーゲンはアテロペプチド型コラーゲンであり、精製コラーゲンの末端部に位置し抗原性に大きく関係するテロペプチドを除去したコラーゲンである。テロペプチド型コラーゲン溶液は有機酸を用いて加水分解することでアテロペプチド型コラーゲン溶液とができる。可溶性コラーゲンのもう一つの好ましい性質としては、架橋度が極めて低いことが上げられる。例えばそれは、0.5%またはそれ未満である。

可溶性コラーゲンは適当な溶媒例えば水に溶解することができ、コラーゲン重量で約1.5～約10%の溶液を調製できる。好ましい濃度としてはコラーゲン重量で約1～約5%であり、より好ましくは、重量で約2%である。

速度制御層はコラーゲン繊維を懸濁させた分散液からも生成することができる。

市販されているコラーゲン繊維 (Titipore Co., Inc., Santa Barbara, California) は適当な溶媒例えば水に分散させることができ、コラーゲン重量で約1.1～約10%のコラーゲン懸濁液を生成できる。好ましい濃度としてはコラーゲン重量で約1～約2%である。コラーゲン繊維の懸濁液中の分散を助長するためには、適当な希釈を溶媒中に存在させることができる。特に適当な酸は約5%濃度の酢酸である。

可溶性コラーゲン溶液または、コラーゲン繊維が懸濁した分散液は溶媒キャスト法を用いてフィルムにできる。

典型としては、コラーゲン溶液を型の中に流し込み、乾燥させるわけである。型としては、乾燥させたコラーゲンフィルムが型表面に粘着してしまわない様に非粘着性の性質を有していることが好ましい。特に適当な型表面は、テフロン<sup>TM</sup>である。適当な条件としては、流延した溶液が乾燥するのに適当な温度、適当な時間が含まれる。一般的に、乾燥温度を上げた場合、乾燥時間は短かくする必要がある。

とりわけ、適性温度とは約15℃～35℃であり、好ましくは室

温である。また適性乾燥時間とは、周辺部における溶媒含量の損失量が本質的にゼロとなるのに十分な時間である。（例えば、乾燥時間は約1時間～約10日、好ましくは約1日～約5日である。）

活性成分の放出速度に作用する最も大切な因子としてフィルムの内厚がある。また可溶剤の速度制御層中の存在の有無/存在量も同様である。なぜならば、それらは乾燥フィルムの内厚を適当なものとするのに重大であるからである。それら速度制御層の特に適当な内厚は約0.01～約1mm、好ましくは約0.05～約0.5mm、最もこのしくは約0.1～約0.1mmである。

本願のコラーゲンフィルムに要求される特性を最大限に發揮するために各種添加物を選び、コラーゲン溶液、フィルムに含有させても良い。それら要求される特性とは、柔軟性、安定性、乾燥促進性、そして活性成分と適合するD日が含まれる。柔軟性を改善するためには適当な可塑性を使用できる。適当な可塑剤とはポリエチレングリコール及びグリセリンであり、好ましくはグリセリンである。これら可塑剤はコラーゲン存在量の重量に対して0～約10%相当量まで添加可能であり、好ましくはコラーゲン重量に対して約10～約30%、最も好ましくはコラ

ーゲン重量に対して約 1% 相当量添加する。

活性成分の安定性を改善するために、適当な安定剤がフィルム中に使用可能である。適当な安定剤としては糖類、好ましくはマンニトール、ラクトース、グルコースであり、より好ましくはマンニトールである。これら安定剤はコラーゲン重量に対して 0 ~ 約 5% 添加可能であり、好ましくは、コラーゲン重量に対して約 1% の添加である。

フィルムの乾燥を促進するために、乾燥促進剤が使用できる。適当な乾燥促進剤としては、アルコールが含まれ、好ましくは、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコールであり、より好ましくはエタノールである。これら乾燥促進剤は溶液または懸濁液の総重量に対して 0 ~ 約 50% 相当量が添加可能であり、好ましくは溶液または懸濁液の総重量に対して約 10 ~ 約 30% 相当量、より好ましくは、溶液または懸濁液の総重量に対して約 10% 相当量を添加する。

使用する特定の活性成分に適切な pH を得るために、適当な緩衝剤がフィルム中に使用可能である。適当な緩衝剤とは、一般に知られ利用されている生物学的緩衝剤のほとんどが含まれ、好ましくは酢酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、より好ましくは酢

酸塩及び硫酸塩である。これら緩衝剤はコラーゲン重量に対して約 1.01 ~ 約 2% 相当量が添加可能である。適当な pH とは活性成分の安定性を維持し、それらの治療効果を最大とし、それらの分解を保護する pH 値をとる。適当な pH は一般には約 3 ~ 約 8 で、好ましくは約 5 ~ 約 8、最も好ましくは、pH 約 7.0 ~ 7.5 の中性である。

通常、活性成分は速度制御層に存在しないが、本発明では意図的に次の様な具体例を試みた。その結果活性成分の速度制御層への処方が開発できた。

しかしながら、速度制御層中に存在できる濃度としては、いかなる活性成分においても、医薬用層中の活性成分濃度よりも低いことが好ましい。

医薬用層は速度制御層と同じ手法で作成する。活性成分を含む速度制御層であれば活性成分を追加する手法で、活性成分を含まない速度制御層であれば活性成分を存在させて作成するわけである。好ましい活性成分としては、次の様な生物学的薬剤がある。創傷治癒促進剤または神経組織再生促進剤、特に組み換えタンパク質である。それら好ましい活性成分とは、血小板由来増殖因子 (PDGF)、上皮細胞成長因子 (EGF)、

成骨細胞成長因子 (FGF)、血小板由来上皮細胞因子 (PDGF)、血小板由来血管内皮細胞成長因子 (PD-ECGF)、ケラチン細胞成長因子 (KGF)、インシュリン様成長因子 1 及び同 2 (IGF-1 及び IGF-2)、腫瘍壞死因子 (TNF)、脳由来神経因子 (BDNF)、毛母細胞由来神経因子 (CNTF)、ニューロトロフィン-3 (NT-3) を含み、好ましい活性成分は PDGF または PD-ECGF であり、最も好ましくは、PDGF である。これら活性成分の存在量としては、例えば創傷治癒能成分の場合、創傷治癒を促進するのに有効な量を存在させる。実際の活性成分の量は臨床医の処置で決定されるであろう。この際には様々な因子によって決定されるであろう、たとえば創傷の疼痛程度、患者のコンディション、患者の年令、並びにいくつかの副報傷客、患者の創傷と別に所有する医学上の病気などがある。一般的には、活性成分の総量としては約 1 mg / g ~ 5 mg / g の範囲であろう。

医薬用層の特に適当な内厚は約 0.01 ~ 約 1 mm であり、好ましくは約 0.15 ~ 約 0.5 mm、最も好ましくは約 0.1 ~ 約 0.15 mm である。

いくつかの方針を用いることで様々な層が互いに接触する。

それら方法の一つとしては、各層どうしが互に隣合う様に置き、外層より圧力を加え、層どうしを一体化させる方法がある。他の一方では各層を複層する前に互いの層表面を溶媒（たとえば水）と接触させることで互いの層表面をコートし、各層の薄い表面部でタンパク質を塗り、その後接触させることで接着させる方法である。他の一方では、少なくとも一つの接触面に公知の接着剤を使用する方法である。その接着剤とは、層からの活性成分の放出を妨害しないことが好ましい。

各層を接触させて行く好ましい方法は均等な圧力を作用させ、各層どうしを接触する方法である。

医薬用層の数は要求される放出特性によって決定する。一般には、層数を増やすことによって活性成分の放出の安定性及び持続性を向上させることができる。好ましくは医薬用層数としては 1 ~ 10、より好ましくは 1 ~ 5、そして最も好ましくは 1 ~ 3 である。活性成分の濃度は異なることも可能であり、また各層間において内厚も同一である必要はない。

速度制御層は複層体の片側または両側末端にあれば良い。片側末端のみに速度制御層を有する複層体は、特に表皮への活性成分の供給に適している。両側末端に速度制御層を有する複層体

は特に、内部創傷または外科切開の様な二面対向創傷への活性成分の供給に適している。複層体の片側末端にのみ速度制御層を有する場合、もう一方の複層体末端層には、裏材層を選択して設けても良い。これら裏材層としては慣例に知られるものであれば何でも良い。一般的には、裏材層はポリウレタン製である。

本発明のコラーゲンフィルムは、その接触した細胞または組織に活性成分を選択的に供給する手段として有用なものである。例えば、火傷または他の皮膚外傷の治療において、速度制御層を一つ、裏材層を一つ有するコラーゲンフィルムを創傷部へ貼ることによって適当な活性成分を外傷を負った部分のみに選択的に供給できる。この様な利用において、PDGFは特に適当な活性成分である。複層体の両側末端に速度制御層を有するコラーゲンフィルムは外科的創傷の治癒促進に使用できる。その様な用途に使用する際には外科切開部位にフィルムを入れ、二つの外科的創傷面が重なり合う間にフィルムがくる様に縫い合わせる。コラーゲンフィルムはまた向神経性因子の選択的供給にも利用できる。その様な利用法の場合、コラーゲンフィルムを神経組織と直接または、その附近部に接触させることで向神経因子で処理することができる。

成長因子溶液（放射性物質を含む、または含まない）をコラーゲン溶液に加えた。テフロン<sup>TM</sup>表面に溶液を流延し、室温下においてフィルムの重量が一定となるまで（約1～3日間）乾燥した。こうして様々な成長因子濃度をもったコラーゲンフィルムを得た。表1に異なる濃度のコラーゲン溶液より調製したフィルムの肉厚を示す。

図6にコラーゲンフィルムからのPDGFの放出挙動として例4の方法により得た様々な単層フィルムからの放出挙動を示した。

表 1

## コラーゲンフィルムの肉厚

## A. 4%コラーゲン溶液

容器の直径	コラーゲン溶液量	フィルムの肉厚
3.0cm	1.5ml	1.8mil
	1.5ml	1.5mil
5.1cm	1.1ml	1.1mil
	1.6ml	1.5mil
	1.4ml	1.1mil

例

次に列举する例は特別な具体例を示す意図で例示するものであり、本発明はこの範囲に限定されるものではない。

## 例1：単層コラーゲンフィルム試料

## A. 可溶性コラーゲン

可溶性コラーゲン溶液の溶媒キャスト法により様々な成長因子を含有するコラーゲンフィルムを調製した。可溶性コラーゲンは、Sees社（Princeton, New Jersey）より購入した。

このコラーゲンはウシ由来であり、11%のI型コラーゲンと1%のIII型コラーゲンとから成っている。コラーゲンの分子量は100Kダルトンであり、密度は1.011g/mlである。コラーゲンよりテロペプチドが除去されているためコラーゲンの抗原性は最小限となっている。

まず、可溶性コラーゲンを0～5%の酢酸溶液に18～20℃下において溶解し約1～8%のコラーゲン溶液を調製した。可溶剤グリセリン（コラーゲン乾燥重量に対して約10%相当量）を添加後、溶液の蒸発を促進するためにエタノールを添加した。アルコール量は溶液の総重量の約21%である。ここで、非溶性物質を除去するため、溶液を遠心した。

## B. 8%コラーゲン溶液

容器の直径	コラーゲン溶液量	フィルムの肉厚
3.0cm	1.15ml	2.5mil
	2.25ml	2.8mil
	1.15ml	2.7mil

## B. コラーゲン繊維懸滴液

不溶性コラーゲン繊維よりウェバーを作成しPDGFの放出速度を測定した。2gの不溶性コラーゲン繊維（Titiphore Co., Menlo Park, California）を約110mlの1.1mlグリセリンを含有する5%酢酸溶液に分散させた。その溶液に、<sup>125</sup>IでラベルしたPDGFを底面量含有するPDGF溶液(112cpm/ml)を約10ml加えた。5mlのアルコールを溶液蒸発を促進するために加えた。三種類の異なる肉厚フィルムを得るために、混合液を三つ流延した。それぞれのフィルムを切削し数個のウェバーを得た。フィルムの平均肉厚は、0.10, 0.15, 1.15mmであり、それぞれフィルム-A, フィルム-B, フィルム-Cとした。各ウェバーからのPDGFの放出速度はFluo-80セル(Crown Glass Co., Somerville, New Jersey)を用いて測定した（畔創膏からの医薬放出速度を決定する時に一般的に用い

られる測定法)。一枚の胶原セルを使用することで、理論的に完全な降下状況が得られた。一枚の Williopsis Co., Bedford, Massachusetts (ボアサイズ 5 mm) を用いて受皿よりコラーゲンウェーハーを分離した。

図 1 にフィルム-A (肉厚 1.1 mm) より切削したウェーハーからの PDGF 放出挙動を示した。24時間内にはほとんどの PDGF が放出されていた。図 2 にフィルム-B (肉厚 0.38 mm) より切削したウェーハーからの PDGF 放出挙動を示した。16時間の内に約 17% の PDGF が放出されていた。

図 3 にフィルム-C (肉厚 0.8 mm) より切削したウェーハーからの PDGF 放出挙動を示した。約 71% の PDGF が放出された。図 1, 2, 3 に示したデータより、PDGF 放出の持続性は 1 日～1 週以上制御できる可能性が示唆される。

#### 例 2: 二層コラーゲンフィルム試料

二層コラーゲンフィルムは、創傷被覆材として生成、利用された。その創傷被覆材は長期間 (12時間以上) 創傷部位に対して成長因子をほぼ一定速度で選択的供給できるものであった。一例を上げると、一つ目のコラーゲン層 (膜 A) を可溶性コラーゲン (4% コラーゲンの 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 4)、0.85%

塩化ナトリウム浴液)、グリセリン (重量比でコラーゲンの 10% 量)、並びにエタノール (浴液の 20% 量) からなる水浴液による浴媒キャスト法により調製した。二つ目のフィルム (膜 B) は PDGF をフィルム中に 20% / g 含むことを除けば一つ目のフィルムとほぼ同一の肉厚 (0.11～3 mm) でかつ同一の組成である。

この二つのフィルムを均等な圧力の作用によりお互いに付け一枚に結合させた。例 4 より得られる 1 mm の放出速度検討によれば成長因子の放出は 12時間以上一定速度でなされていた (図 4)。

#### 例 3: 多層複層コラーゲンフィルム試料

三層または四層フィルムは長時間、成長因子を放出する装置として調製された。一例として、四層フィルムを次の手法で調製した。例 1 A の様にして、四枚の異なるフィルムをキャスト法にて得、均等な圧力の作用のもとでそれを付着させて一枚のフィルムに結合させた。それぞれの層の肉厚は近似していたが、異なった肉厚の厚を用いても良い。皮膚と接触することになる第一コラーゲン層には PDGF は含まれていない。第二、第三、第四層にはそれぞれ 0.01%、0.1%、0.3% の濃度で

PDGF を含んでいる。

続く、放出性検討において、ほぼ一定した成長因子の放出が 110 時間以上維持された (図 5)。その時、成長因子のおおよそ 90% が放出されていた。

#### 例 4: 放出速度の測定

活性成分のコラーゲンフィルムからの放出速度は Custer Transwell Cells ('Cell') (Custer Co., Cambridge, Massachusetts) を次の様に使用することで導き出せる。コラーゲンフィルムは例 1, 2, 及び 3 に記述した様に生成した。またウェーハー (1.6 cm 直径) はフィルムを切削して生成した。各ウェーハーは Custer Transwell Cell に移し、ポリカーボネート製皿の上に乗せた。2.5 ml の展開浴液 (水及び 1% ウシ血清アルブミン、または水及び 0.1% ヒト血清アルブミン) を Cell ホルダー中に入れた。各 Cell は浴液の中にセットして放出性検討を開始した。

特定の時間において、21皿の展開浴液を分取しそれと同量の新鮮液を展開浴液に戻した。試料分取は 21皿の試料を得ることと同じ手続を繰り返した。試料の放射性はガムカウンター (Packard Instruments, Co., Irradi. California) にて測定し

た。展開浴液中のタンパク質濃度は随時放射性に基づいて計算し他の方法、例えば、ELISA 法及び 3 H-トリミジン取り込みバイオアッセイ法により確認した。この分析より得られる結果は例 1, 2, 及び 3 の様々な複層と肉厚の結果に示した (図 1～6)。図 7 は様々な方法でタンパク質濃度を測定した結果が測定法によらず一致していることを示している。

フィルムが標準的条件下において生成され、浴媒が同一条件下において完全に蒸発した場合、拡散係数はフィルムの肉厚に依存しないはずである。一般に、单層コラーゲンフィルムからの PDGF の放出挙動は、次の式で説明できる。

$$F = 2.18 \times (D^{1/2} / L) \cdot T^{1/2}$$

ここで F は時間 T における医薬放出のフラクション

D は調製したフィルム中の PDGF の拡散係数

L は調製したフィルムの肉厚

である。

式から F 対時間の平方根は一次関数で比例することがわかる。F 対時間の平方根プロットより、PDGF の放出量と時間の平方根の間には線型関係があることがわかる。

拡散係数 (D) はプロットの傾き、及び式中に用いたコラ-

ゲンフィルムの乾燥率・内厚より計算できる。フィルムの内厚を $1.15\text{mm}$ として計算した場合、拡散係数は $3 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{sec}$ となる。この値は、ゲル膜中におけるPDGFの拡散係数の値よりもかなり小さい。

影響したコラーゲンフィルムの測定は実測が難しいので、次の様に見掛けの拡散係数( $D_a$ )を定義する。

$$D_a = D (L_0 / L)^2$$

ここで $D$ 及び $L$ は先の様に定義し、かつ $L_0$ 乾燥フィルムの内厚である。見掛けの拡散係数( $D_a$ )は次式による $F$ 対時間平方根プロットの傾きより求められる。

$$F = 2.26 \times (D_a^{1/2} / L_0) T^{1/2}$$

図6に活性成分の放出速度の様々な比較検討結果を示した。この放出速度測定法を用いれば、フィルム内厚がPDGF放出速度に及ぼす影響を調査できる。フィルムを標準条件下で生成し、同一条件下で溶媒を完全に除去したとすれば拡散係数は内厚に依存しないはずである。先に示した三番目の式から $F$ 対 $T^{1/2}$ プロットの傾きはフィルムの内厚値と逆比例することがうかがえる。

キャストフィルム形成法の境界を調べるため、同一コラーゲ

ン溶液より、乾燥条件を同じくして四種類のフィルムを生成した。どのフィルムもにおいても、それぞれの個体は類似の内厚に生成できた(A属: 0.011mm, B属: 0.11mm, C属: 0.16mm, D属: 0.21mm)。

予想通り、成長因子の放出速度はフィルムの厚みの増加により低下した。このデータより計算したコラーゲンフィルム中におけるPDGFの見掛けの拡散係数は、A, B, C及びD属のフィルムで、それぞれ 1.5, 1.1, 1.3, 及び 1.6(全て $\times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{sec}$ )であった。理論的には拡散係数はフィルムの内厚にかかわらず同一のはずである。この結果より、流延フィルムキャスト法は少なくともフィルム内厚が $0.16\text{mm}$ までは非常に信頼性の高いフィルムが得られることがわかる。

$0.21\text{mm}$ における拡散係数が高い値となったのは、溶媒の蒸発が不完全であったために厚めのフィルム中に溶媒が残存していたことによると思われる。このことは厚いフィルムの作成には乾燥時間の延長またはより高い温度が必要であることから裏付けられる。

さらに、PDGFの初期濃度がその放出挙動に与える影響を検討するために、7種のフィルムを作成した。全てのフィルム

は近似的の内厚(約 $0.15\text{mm}$ )でPDGFの濃度のみが異なる様に作成した。7種の全てのフィルムにおいて、非常に類似した放出挙動が観察された。

さらに表2に7種のフィルムのそれぞれの見掛けの拡散係数を示す。

表 2

PDGF濃度の影響

フィルム	濃度	$D_a \times 10^{10} (\text{cm}^2/\text{sec})$
A	1×	1.01
B	1×	1.11
C	2×	1.61
D	5×	1.51
E	10×	1.36
F	10×	1.12
G	10×	1.11
平均	—	$1.11 \pm 0.21$

例5: Blood-Bridge モデルによる組織

量の測定

10個体のルイスラット(125~150g)において、左脛骨後部及び大脛部の動静脈血管束を足首部より鼠径部剪節部まで切開した。直徑 $1.6\text{cm}$ の二枚のコラーゲンディスクを用いて血管束をはさみ込み、さらにその中にスプーン形状をしたシリコングムを入れた。15個体のラットには、156回の組み換えBB-PDGF(PDGF二量体、米国特許出願(54,194 及び 611,451 それぞれ1989年12月13日、1990年12月13日出願)を含有するコラーゲンディスク残り15個体は対照として成長因子を含まないコラーゲンディスクを用いた。対照及び実験用動物を5個体づつ5, 10, 及び15日目に解剖した。シリコングムの大きさを肉眼、並びに計数比コンピューター及び組織形態測量的三次元復元によって評価し、発生組織量を決定した。

結果を表3に示した。

表 3

時間(日)	組織発生量 (mg + 標準偏差)	
	対照	P D G F
5	11.6 ± 10.1	31.8 ± 15.0
10	15.3 ± 9.8	165.9 ± 21.4
15	17.1 ± 10.7	203.0 ± 23.5

図 6 : ウサギ耳部モデルを用いた創傷治癒測定

この例は、外科的手法によってウサギ耳部位に与えた直徑 6 mm の皮膚潰瘍の治癒速度に対してコラーゲンフィルム中の成長因子が及ぼす影響を測定したものである。この切削創傷モデルによって全層皮膚創傷（例えばヒト脚部潰瘍）に関する治癒パラメーター（例えば、わずかな創傷の収縮、肉芽新組織の発生、上皮被覆）を模写することができる。創傷の収縮による変化量を算出すれば、先の全層創傷モデルによって上皮被覆及び肉芽組織形成の両方を組織学的に定量することができた。さらに付け加えるならば、軟骨が無血野であるが故に、軟骨膜を外科摘出した時にも、肉芽新組織及び新しい上皮が創傷周縁部より単独で成育する。この外科手術においては P D G F を投与した。

Medical Center, Division of Technical Services, St. Louis, Missouri) 上に固定した。この時、バークランプを二つ利用し、一つは先端、もう一つは耳の付け根に、血流を妨またけない様にウサギの耳を固定した。動物を滅菌した布で包み込み、術野（ここでは、露出させた耳の内表面）に Iodine を噴き付け、3 ~ 5 分間乾燥した。

#### B. 創傷処理

創傷処理行程は首尾無間的手法で行なった。頭微外科機器、6 mm 歪状ノコギリ、（トレフィン）、及び両眼頭微鏡（10×、15×）を用いて各ウサギの耳内面部を静かに切り剥み、6 mm のバイオブシースとした。

次いで、そのバイオブシース部位より全ての組織及び組織（骨膜をも含む）を軟骨が露出する深さまで摘出した。この時、頭微外科钳子、鋸切りバサミ、2 mm 間エッジレンパート骨膜エレベーターを用い、無菌チップを当てがった。軟骨膜及び付加組織を解離し除去した。バイオブシース穴より軟骨を完全に切削することは実験の目的上必要ないことである。しかしながら、部分的な厚みで軟骨を切り剥むことは避けがたい。

軟骨中の全ての剥み目又は自然穴の位置を注意深く標記し記

#### A. 手術前準備

各個体が約 1.1 ~ 1.5 kg の若成年ニューターキー・ランドシロウサギ (M & K Laboratory, Landshut, Bayern, West Germany) に対して Iodoform® (Farbenfabriken, Badische Anilin-und Soda-Fabrik, Ludwigshafen, Rhine, West Germany) を麻酔剤として使用後（10分後）、ケタミン (10mg/kg) 及びキシライン (5mg/kg) の両方を筋肉内投与して麻酔をほどこした。小さな綿またはガーゼ栓を全てのウサギの両耳に入れた後、両耳の内面及び外端縫合部をアニマルクリッパー（#11ブレード）を用いて剃った。市販の脱毛クリーム Eel® を各ウサギ耳内面部に塗り、10分後に乾燥ガーゼにて拭き取った。

耳内面を塩溶液含浸ガーゼに拭き、続いて 10% アルコール溶液で拭いた。全てのウサギの片方の耳内面皮膚組織層に 10 ゲージ針を用いて 1 : 1000 の割合で 100 相当のエピネフリンを含有する 2% キシロカイン溶液を浸漬により浸透させた。（1.5 ~ 1.8 mg が必要）。次にこの浸透部位を 3 回 Iodine によりこすり洗いし続けて 10% アルコール溶液を用いて行なった。必要なならばここで耳栓を乾燥した栓と交換した。

次にウサギを無菌外科手術室へ移し、浸透させた側の耳をフレッキシガラス製 “イヤーボード” (Washington University

販売) に固定した（評価時の対照のため）。

創傷部位が過血状態とならない様に無菌的に指チップを当てがってバイオブシース部位より血液を除去した。各々の完成バイオブシースは小さな塩溶液含浸ガーゼにて包んだ。各々の創傷耳に四つの成熟した 6 mm 潰瘍バイオブシースが正中線（ボード上に固定した耳を折りたたむことによって定義される）に対して両側に二つづつできた。

5 つ以上のバイオブシース部位を付けた耳は一つもなかった。それぞれのバイオブシース部位は最低でも 1 mm は離した。処理が完了した耳は塩溶液含浸ガーゼにて包みテープにて包囲し P D G F の投与まで湿润状態を保った。次にもう一方の耳を、こすり洗いし、固定した後、先の耳と同様に創傷を付けた。各々の耳のバイオブシース部位より血液を除去し完成した各々のバイオブシース部位を小さな塩溶液含浸ガーゼで包んだ。処理が完了したもう一方の耳についても、P D G F 投与の時まで塩溶液湿润ガーゼにて包んだ。創傷処理実験中のここまででの時点で明らかに麻酔が切れたと思われるウサギについては、15mg/kg のケタミンを筋肉内投与し、再度麻酔をかけた。

C. 削傷への活性蛋白質の影響

可溶性コラーゲンよりウェバー当りに 5.1% の PDGF を含むコラーゲンウェバー（直径 1.5cm）を作成した。

外科的調査、臓器のもとでウサギを麻酔よりしました。覚せいに当って、プラスチック性ネックカラー（Cervical Collar, St. Louis, Missouri）をウサギの首まわりにウサギが創傷または被覆物を噛さないように巻いた。ここでネックカラーは広げると約 15~25cm になる。ウサギは評価を行なう時まで個別のカゴに入れた。評価の時までにネックカラーがはずれてしまったウサギの創傷及び何らかの原因で *Tegaderm*® が壊れた時の創傷については、発覚後すらやかに再評価し、創傷にダメージが見られる場合分析用母体より放棄した。

D. 結果

ウサギを解剖する際、手術前準備に記述した方法と同様に麻酔した。各々のウサギは体重を測定し記録した（各々の創傷は写真撮影した）。また創傷状態の質的説明を記録した。この時特に *Tegaderm*® の有無、被覆材下の過度の分離物の有無に注意した。ウサギは心臓内への 50ml / kg の空気注入により空気閉塞させた。ナイフハンドルに #15 サージカルブレードを取り

付け、これを用いてウサギの両耳を体より切離した。各々のバイオブリー（*Tegaderm*® には手をつけず、約 5mm 周辺の組織もろとも）を耳より切離し、正中線より正確に二分するためにバイオブリー部位を測定した。ここでは、創傷処理を行なった日の記録を参考し軟骨中の自然穴または切り創り跡を避けた。バイオブリーは片刃カミソリを用いて注意深く二分した。この時、創傷定位を破壊しない様に一回のみの鋭切り動作で二分した。二分したバイオブリーは即時、ウサギと両耳をラベルしたカセットに移し、10% のホルマリン緩衝液で固定し、組織学的評価へまわした。

E. 組織学的定量分析

予備実験では、組織学的分析方法によって創傷処理を行なわない時より、創傷処理後 3, 5, 7, 10, 及び 14 日まで確認した。3 日目において上皮被覆は見られなかった。

10 日目及び 14 日目では全ての創傷が全面、上皮被覆された。その結果、5 日目及び 7 日目についてさらに分析を行なった。注意深く二分した面より 5mm の位置の創傷断面を包埋、切断、ヘマトキシリシーアイオシン染色した。

創傷の真中心部の断面を得るために、切断面の凹凸を最小限にした。上皮被覆面と創傷面とのギャップ（EG）、肉芽組織

の創傷端部から高さの最大値（MH）、及び肉芽組織面の創傷面とのギャップ（G TG）を目盛り付きレンズ装着マイクロメーターにて測定し、単位をミリメーター (mm) に換算した。測定に際しては二人の個別の測定者によりスライドの番号を知らせることなく行なった。

測定終了後（スライド番号公開後）両測定者の測定値の平均を計算し、統計学的に分析した。両測定者の測定値は全般的に 5% 程度の相違におさまっていた。

創傷直後の創傷の組織学的分析により、EG 及び G TG が、それぞれ 5.31 及び 21 (平均土標準偏差 6 個体) と得られた。これらは予想通りの値であった。ここで外科的創傷方法、創傷二分手法について確認を行ない、次の組織学的分析へ回した。新肉芽組織（NGT）の発生は創傷を負わした日の G TG 値 (5.11mm) より、創傷後日の測定日の G TG 値より差し引いて計算した。創傷は同心円的に周縁より治癒し、収縮がないと言う仮定のもとで、おおよその新肉芽組織の面積及び体積を計算した。計算にあたっては、評価日の創傷面積 (G TG 値より計算した) を創傷を負わせた日の面積 (11.7cm<sup>2</sup>) より差し引いて求めた。創傷を負わせた日には、創傷周辺部にインディアインクを入れ墨し、治癒中の収縮の程度を評価した。7 日後、創傷

の直径に変化はなかった。感染が見られる創傷 (5% 未満) または乾燥した創傷 (5% 未満) については、測定対象より除外した。

臨床的に感染が見られなかった創傷について培養を行なったが、病原体の生育は見られなかった。

SAS ソフトウェアを用いて無周期変数及び周期変数統計分析を行なった結果を表 4 に示す。同様の実験を、P D E C G F を含有するコラーゲンウェバーを用いて行なった。MH 値及び新肉芽組織の計算値を図 8 に示す。

表 4

	対照		PDGF- $\beta$	
	コラーゲン ウェバー	PDGF- $\beta$ 被覆	コラーゲン ウェバー	PDGF- $\beta$ 被覆
MH	16.1 ± 1.7	16.3 ± 1.3	16.1 ± 1.3	16.1 ± 1.1
G TG	11.1 ± 5.15	15.0 ± 3.7	11.1 ± 4.2	10.1 ± 3.5
Rev G TG	124.7 ± 51.52	118.5 ± 61.9	122.6 ± 41.8	151.9 ± 60.4
Area of Rev GT (cm <sup>2</sup> )	1.1 ± 1.6	0.2 ± 0.1	1.6 ± 1.6	0.0 ± 1.9
EG	11.1 ± 37.1	152.4 ± 156.5	141.5 ± 14.0	181.1 ± 46.7
Tel of Rev GT (cm <sup>3</sup> )	6.3 ± 2.8	7.0 ± 4.3	1.1 ± 1.1	10.7 ± 4.1

## 図7: ウサギ耳の引抜モデルによる創傷治癒測定

Animal Care and Use Committee 規定の倫理承認のものとて、耳中央部球状創傷モデルを動物において実行した。2.1 ~ 1.5kg のニュージーランドシロウサギ (Dot Tally Farms, Somerville, Arkansas) をアテロビン (1.1mg/kg) 及びアセプロマジン (0.15mg/kg) を皮下注射し、予備麻酔を行ない10分後に、ケタミン (0.75mg/kg) 及びキシラジン (5mg/kg) により麻酔した。ウサギ皮膚を #10ブレードにより刺り、無菌的に外科手術の準備をした。正中線1cmにわたり開腹し、盲腸を避け、球状膜及び約2cmの盲腸を露出した。球状膜より遠位にある膨起2つを選び、対とし、3cmの球状切開を盲腸の長さ方向と平行に入れ、さらに110度反対側にも入れた。最初の二切開床よりも遠位から、さらに二つの膨起を選び、同じ様に2~3cmの切開を入れた。再現性のある外科手術水準とするために、切開を入れるのは球膜及び筋膜に歯压し盲腸粘膜層には手をつけなかった。

次にコラーゲン細片を創傷内に粘膜筋板に対して平となる様に入れた。切開は5~10ポリプロピレン縫合糸 (Ethicon Corp., Somerville, New Jersey) により縫い合せた。この時

一センチメーター当たりに5針の縫合で創傷縫合より2ミリメートルの部位より離合した。縫合糸は皮膜、筋、盲腸筋板を通り、各層を引き寄せ、コラーゲン細片を粘膜筋板と離合した。最後の一針の離合時に、対用創傷では結び目を切り、実験用創傷においては、そのままにしておいた。このため評価時においてのあらゆるミス要因が除去できるわけである。四ヶ所の創傷において、治療実験処理とビヒクル単独処理 (対用) を注意して行なった。開腹切開部は標準的手法で離合した。ウサギは標準飼料 (Tecniplast rabbit chow, Illinois) によって飼育し、水は隨時与えた。また創傷された環境下で独立室に入れ飼育した。予定日に、ウサギ耳端静脈よりペントバルビタール (150mg/kg) を静注し、人道的安楽死をさせた。盲腸の創傷切片を摘出し、含有物を徹底的に洗浄した。

各々の創傷より離合糸を無血的に抜糸し、8mmと規格した細片を Peachtemplate (Washington University machine shop) を用いて3本づつ各々の切開に対して直交する様に切り取った。組織学試料は創傷細片間の部位より採取した。各々の切開より採取した3本の細片 (実験用6個体、対用6個体) において、張力計 (Tensometer 10, Massachusetts, St. Louis, Missouri) を用い

て1/mg単位レベルで創傷破壊強度を測定した。明らかな感染、血腫が見られる試料、または接着度が明らかに低い試料は無視した (分析対象から無視した創傷は全体の2%未満であった。)

張力計試験は電気的鉗子クランプを用いて20mm/minの速度で全ての創傷について行なった。これは創傷部位でのみ破壊が起こる様にするためである。張力測定学解析は三つのカテゴリ (基本組織、肉組織、及び盲腸組織) に分けて行ない、各々別にデーター報告した。組織学的解析は、各母体より離合した試料について行なった。試料をマイクロカセットに詰い込み、ホルマリン中に保管し、後日ヘマトキシリントーイオシン染色した。ここで組織学的試料の内厚、肉芽組織量、及び壊死兆候を評価し、結果を記録した。

盲腸組織における結果を図9に示す。

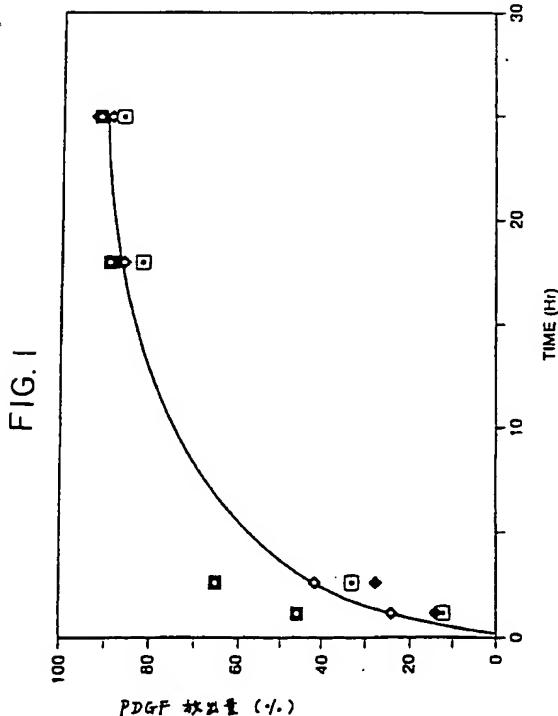


FIG. 2

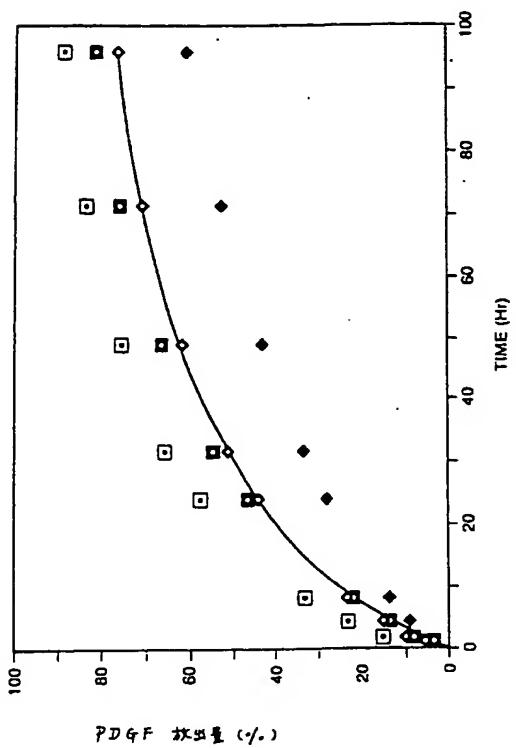


FIG. 3

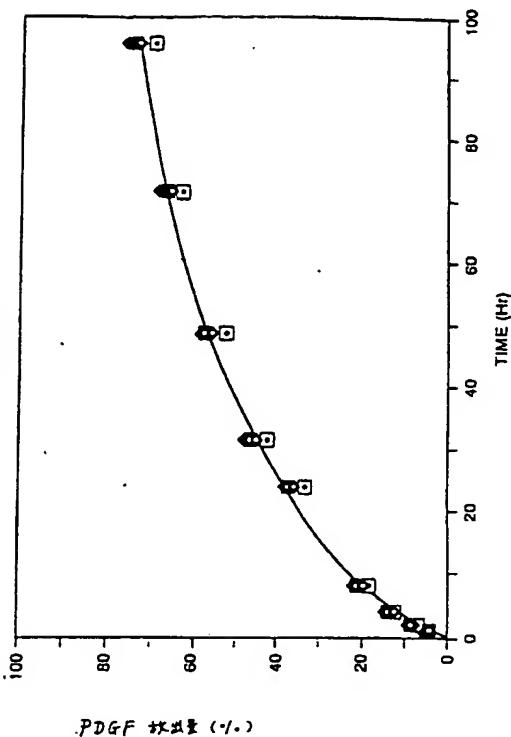


FIG. 4

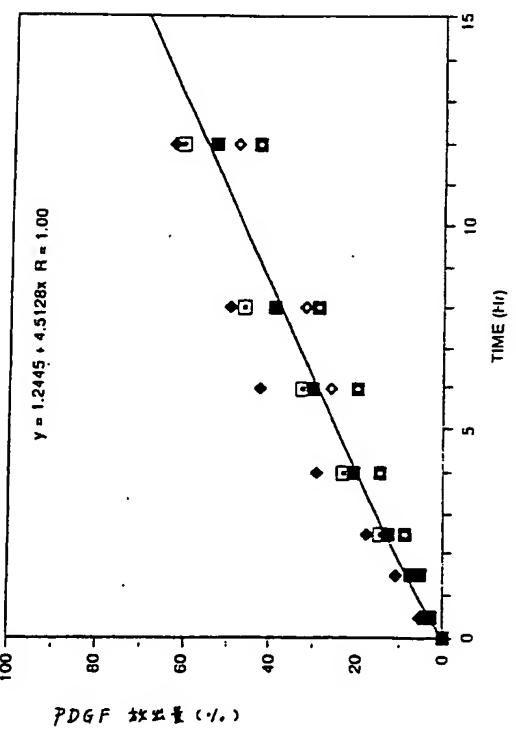


FIG. 5

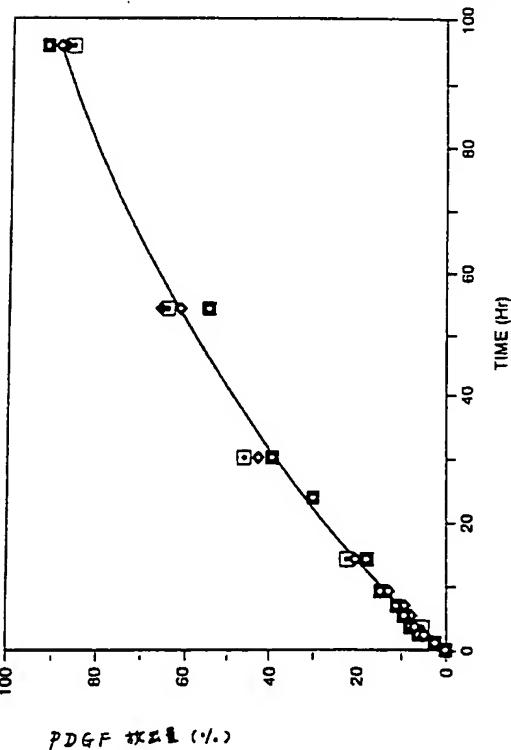


FIG. 6

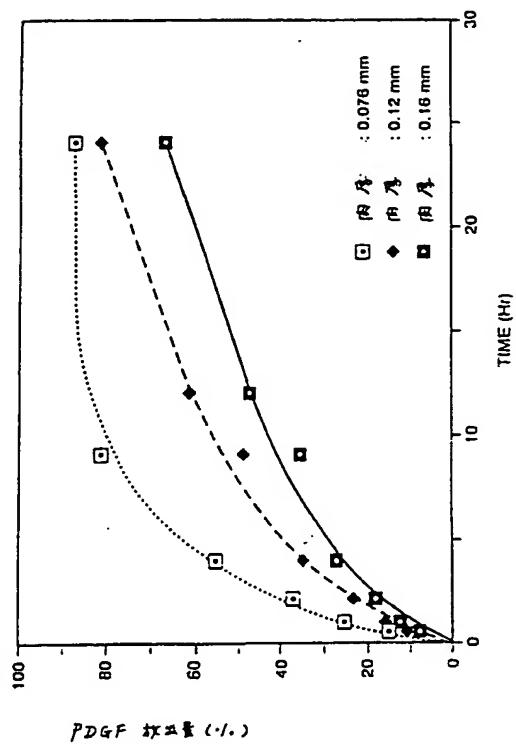


FIG. 7

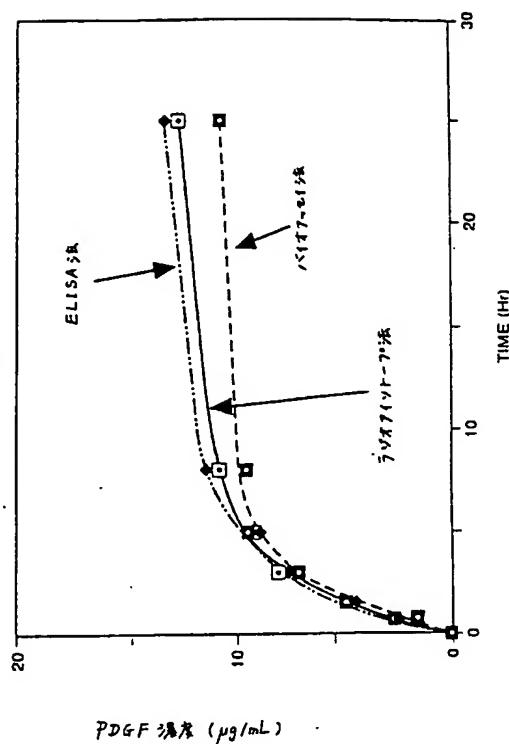


FIG. 8

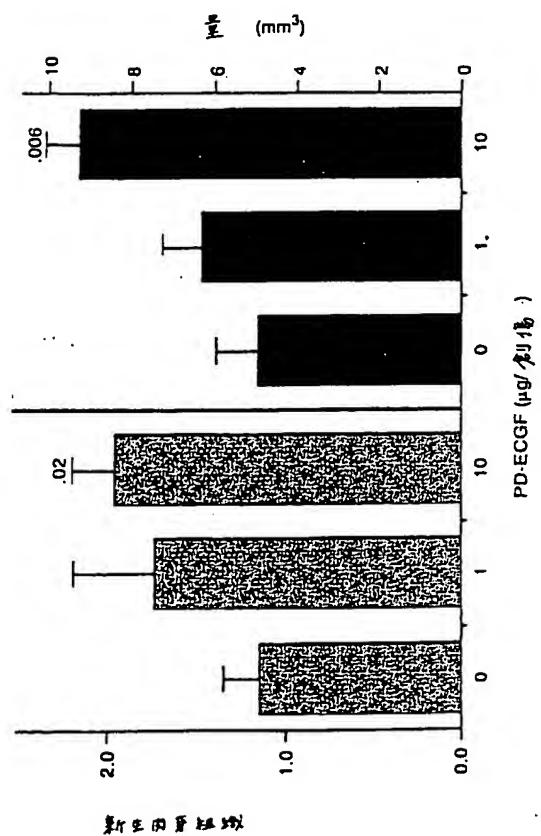
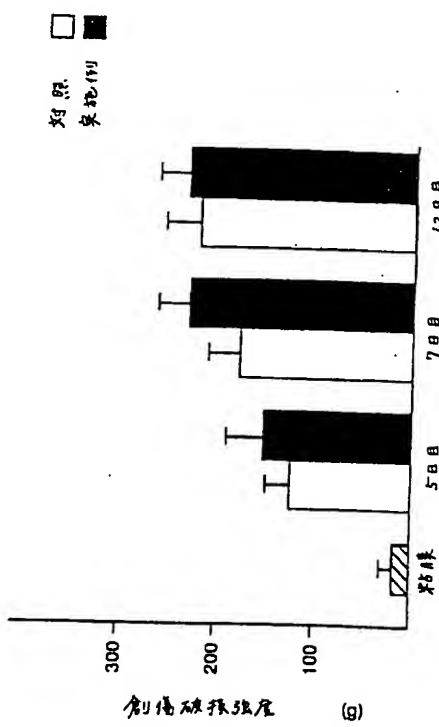
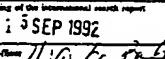


FIG. 9



International application No. PCT/AU92/00492		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> CPC(2) A41E 31/04; A41F 1409 US CL 434/182, 440, 441; 128/191, 604/304 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Maximum documents searched (International system followed by classification symbols) U.S. : 424/423, 443, 444, 445; 128/156; 424/313.3; 604/304		
Documentation searched other than maximum documentation in the system that such documents are included in the fields reported		
Documents have been examined during the International search (name of date last used, where applicable, search terms used) APS Search Term: refugees and vessel and reservoir (A1) + Li and growth (A4) however?		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Class of documents with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	U.S. A. 4,119,605 (CHYAPCO) 14 April 1972, see the abstract, the figures and columns 2 (line 19-39) and the paragraph including column 2 (line 2).	1-44
Y	U.S. A. 4,059,244 (QUARFOOT) 29 March 1978, see the abstract, the figures and the examples.	1-44
Y	U.S. A. 4,068,402 (LEZBROVICH) 23 February 1978, see the abstract and column 6 (line 15) to column 9 (line 77) and the examples.	1-44
Y	U.S. A. 4,737,254 (QUARFOOT) 23 July 1982, see the abstract, the figures drawings and the examples.	1-44
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> See parent family sheet.		
<input type="checkbox"/> Inserted竚epository of cited documents <input type="checkbox"/> The cited documents are the prior art which is not considered to be of prior art significance		See parent family sheet.
<input type="checkbox"/> The cited documents published after the International filing date or inventiveness date are not considered to be prior art under the relevant provisions of the Convention, or under the principle of novelty underlying the claimed invention		See parent family sheet.
<input type="checkbox"/> The cited documents published before the International filing date or inventiveness date are not considered to be prior art under the relevant provisions of the Convention, or under the principle of novelty underlying the claimed invention		See parent family sheet.
<input type="checkbox"/> The cited documents published before the International filing date or inventiveness date are not considered to be prior art under the relevant provisions of the Convention, or under the principle of novelty underlying the claimed invention		See parent family sheet.
<input type="checkbox"/> The cited documents published before the International filing date or inventiveness date are not considered to be prior art under the relevant provisions of the Convention, or under the principle of novelty underlying the claimed invention		See parent family sheet.
<input type="checkbox"/> The cited documents published before the International filing date or inventiveness date are not considered to be prior art under the relevant provisions of the Convention, or under the principle of novelty underlying the claimed invention		See parent family sheet.
<input type="checkbox"/> The cited documents published before the International filing date or inventiveness date are not considered to be prior art under the relevant provisions of the Convention, or under the principle of novelty underlying the claimed invention		See parent family sheet.
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the International search report
10 AUGUST 1992		13 SEP 1992
Name and mailing address of the ISA International Bureau of the World Intellectual Property Organization P.O. Box 500 P.O. Box 500 Postal Code: 1000 Country: NOT APPLICABLE		Authorized officer  NATHAN M. RUTTER Telephone No. (707) 226-2331

## フロントページの続きを読む

(72) 発明者 ピアス, グレン・エフ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア・91360,  
サウザンド・オーパス, リンウッド・スト  
リート・645

(72)発明者 ピット, コリン・ジー  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91361、  
ウエストレイク・ビレッジ、リーワード・  
サークル・2379

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**